



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

다공성 실리카 나노입자를 기반으로 한
분자량이 큰 단백질의 세포 내 전달
연구

Pore expanded silica nanoparticle
based delivery system applicable for
large proteins

2014 년 12 월

서울대학교 대학원
화학부 유기화학 전공
함 슬 범

다공성 실리카 나노입자를 기반으로 한
분자량이 큰 단백질의 세포 내 전달
연구

Pore expanded silica nanoparticle
based delivery system applicable for
large proteins

지도교수 민 달 희

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2014 년 12 월

서울대학교 대학원

화학부 유기화학 전공

함 슬 범

함 슬 범 의 이학석사 학위논문을 인준함

2014 년 12 월

위 원 장 _____ (인)

부 위 원 장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

Abstract

단백질 전달 시스템의 개발은, 단백질이 기초생물학과 다양한 질병 관련 치료학에 대한 유용한 도구로서 큰 잠재력을 지님에도 불구하고, 단백질 고유의 특성들로 인해 진전이 까다로운 분야이다. 그래서 mesoporous silica nanoparticle (MSN)을 이용하여 단백질의 변형이나 유기 용매의 사용 없이 수용액 상에서 단순히 입자와 단백질을 섞음으로서 쉽고 안전하게 complex를 형성하는 과정을 통해 다양한 단백질들을 세포 내로 효율적으로 전달하는 system을 개발하였다. 또한 MSN이 지닌 큰 기공은 단백질이 protease에 의해 분해되는 것로부터 보호하는 효과가 있음을 증명하였다. 큰 단백질을 이용하여 이러한 결과들을 얻었음에 기초해, 우리의 시스템이 통상적인 세포 내 단백질 전달 도구에 잠재력을 지니고 있음을 제안한다.

Keywords : 단백질 전달, 나노 운반체, 세포 내 전달, mesoporous silica nanoparticle

Table of contents

1. Introduction	1
1. 1. 단백질 전달	1
1. 1. 1. 단백질 전달이 당면한 도전 과제.....	1
1. 1. 2. 단백질의 세포 내 전달을 위한 나노 운반체	4
1. 2. Mesoporous Silica Nanoparticle.....	9
2. Experimental Section	12
3. Result and Discussion.....	15
4. Conclusion	22
5. Reference	23
Abstract (in English)	27

1. Introduction

1.1. 단백질 전달

고분자 아미노산들로 구성된 단백질은 자연적으로 발생하는 고분자이며, signaling, 생체변환 반응에서의 효소, 면역 체계에서의 항체 역할 등, 살아있는 유기체에서 일어나는 생리적·생물학적인 모든 과정에서 핵심적인 역할을 수행한다.^{1,2} 따라서 이러한 단백질의 기능을 밝혀내는 것은 분자 생물학이나 치료학 분야에서 이루어지는 주된 연구 주제이다. 실제로 대부분의 질병들이 세포 내 단백질의 기능 변화에서 발생하므로, 살아있는 유기체 내 특정 세포나 조직에 활성을 유지한 상태로 전달하는 것은 생체 의학에서 매우 중요한 연구 분야이며, 또한 가장 결정적이고 신뢰도 높은 결과를 얻어낼 수 있는 수단이기도 하다.^{3,14}

이러한 단백질 전달 시스템을 발전시키기 위해 여러 시도가 이루어지고⁴⁻⁶ 다양한 운반체들이 개발되었으며, 최근 많이 이용되어 온 나노 기술은 나노 물질 고유의 특성을 통해 운반 도중 분해되거나 변성되는 것으로부터 운반 물질을 보호할 수 있으리라 기대되어 세포 내 단백질 전달 분야에 이용되어 왔다.⁶⁻¹³ 하지만 단백질이 가지고 있는 고유한 특성이 주요 장애물로 작용하여, 활성을 가진 단백질을 세포 내 세포질로 전달하는 범용적인 전달 운반체를 개발하는 연구는 항상 어려움을 겪어왔다.¹⁵

1.1.1 단백질 전달이 당면한 도전 과제

단백질이 치료제로서 가지고 있는 수많은 매력적인 특성들에도 불구하고, 단백질은 중요한 한계점들 또한 지니고 있으며, 그 한계점의

대부분은 단백질 자체의 구조에서 기인한다. 단백질은 복잡하고 큰 구조를 지닌 분자들로서, 작은 분자량을 가지고 있는 다른 일반적인 약물들과 달리 2~4차의 고차원적인 구조를 유지하고 있다. 그 구조에는 화학적으로 활성을 지닌 결합들과 결합지 사슬들이 포함되어 있고, 이런 불안한 구조는 단백질이 가지는 활성과 긴밀하게 연관되어 있으므로 전달 시스템의 모든 단계에서 구조를 온전히 유지할 수 있어야 하며, 그렇지 않으면 단백질의 활성이나 면역력이 크게 떨어지거나 완전히 사라지게 된다. 그 예로 aggregate되어 구조가 변형된 human growth hormone이나 insulin의 경우 그렇지 않은 형태에 비해 활성이 떨어짐이 밝혀졌으며,^{2,16} 구조의 변형에 따른 이러한 영향은 단백질 전달 시스템을 설계하는 데 있어 상당한 장애물이 된다.²

이러한 구조적인 한계는 단백질의 세포 내 전달을 상당히 까다로운 주제로 만들게 된다. 일반적인 분자들은 덩치가 작으며 안정성이 높고 친유성기의 성질을 충분히 지니고 있기 때문에 정교한 전달 시스템 없이도 세포 내를 통과하여 원하는 목적지까지 가는 것이 가능한 반면, 단백질은 거대한 크기 뿐 아니라 그 고유의 특성들 - 친수성, 복잡한 구조, 다양한 표면 전하 등 - 로 인해 통상적인 시스템으로는 한계에 부딪히게 된다.

전달 과정 중 단백질이 생체 내에서 일으킬 수 있는 여러 화학 반응 역시 세포 내 전달을 어렵게 하는 주요 요소가 된다. Methionine의 경우 oxidation에 의해 그 활성을 잃어버리기 쉬우며,¹⁷ 생체 내에서 일어날 수 있는 deamidation은 lysozyme의 촉매 활성과 ribonuclease의 활성에 영향을 끼치게 되는데,^{2,18} 이러한 화학 반응들은 치료 목적으로 쓰이는 단백질들에서 흔히 일어날 수 있는 현상들이다.²

따라서 효율적으로 단백질을 전달하는 운반체가 되려면; 1) 로딩된 단백질의 효능이 유지되는지 2) 다양한 크기, 표면 전하, 그리고 형태를 가진 다양한 종류의 단백질에 적용 가능한지 3) 수용액 상에서 단백질 로딩이 용이한지 4) 운반체의 위치를 확인할 수 있는 imaging이

가능한지 5) 큰 크기의 단백질을 로딩할 수 있으며 생체 내 여러 protease로부터의 분해를 보호할 수 있는지 등의 조건들을 만족해야 한다.

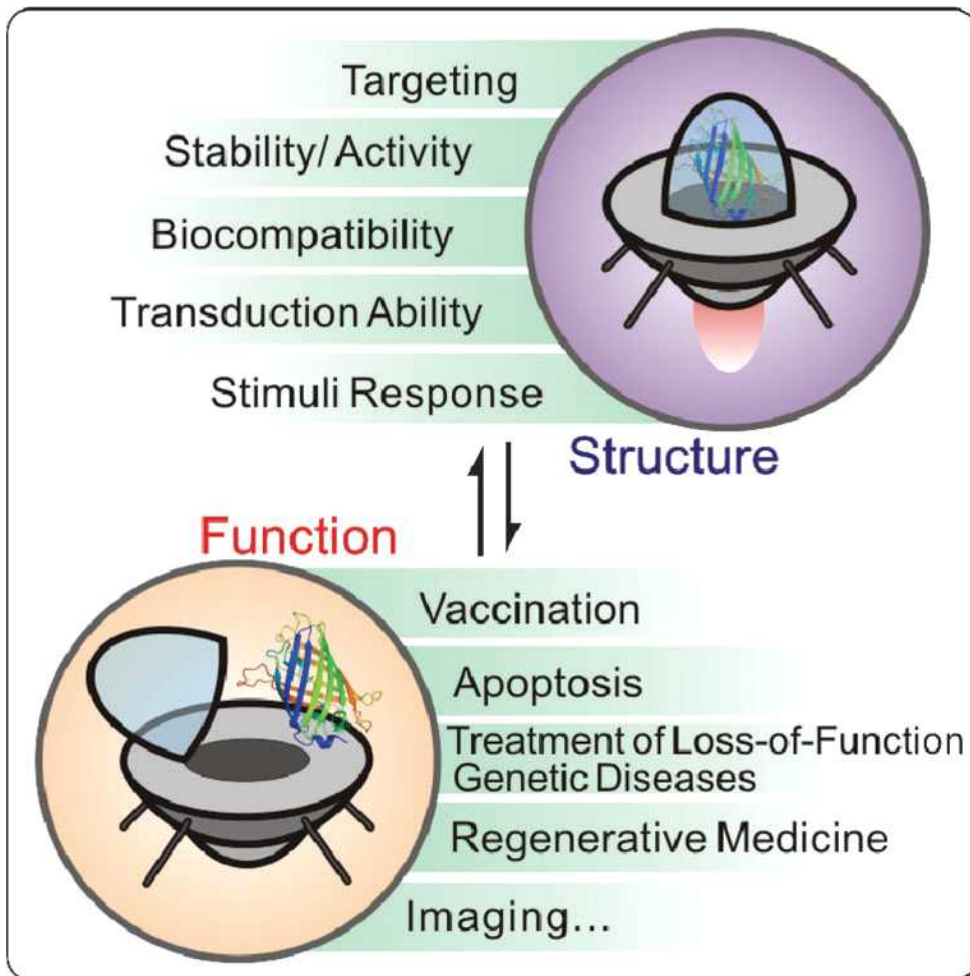


그림 1. 세포 내 단백질 전달을 위한 나노 운반체 제작에 관한 모식도.¹⁴

1.1.2 단백질의 세포 내 전달을 위한 나노 운반체

위에서 언급한 조건들 이외에도 운반체는 단백질 화물의 endolysosomal escape을 도와줄 수 있어야 한다. 그림 2는 세포 내 단백질 화물을 지닌 전달체들의 일반적인 endocytic pathway process를 모식도로 나타낸 것이다. 단백질 화물이 cytosol, mitochondria, nucleus 등 목표하는 곳까지 성공적으로 도달하기 위해서는 거친 lysosomal한 조건에서 분해되지 않고 endosomal pathway를 탈출할 수 있어야 한다.^{14,19}

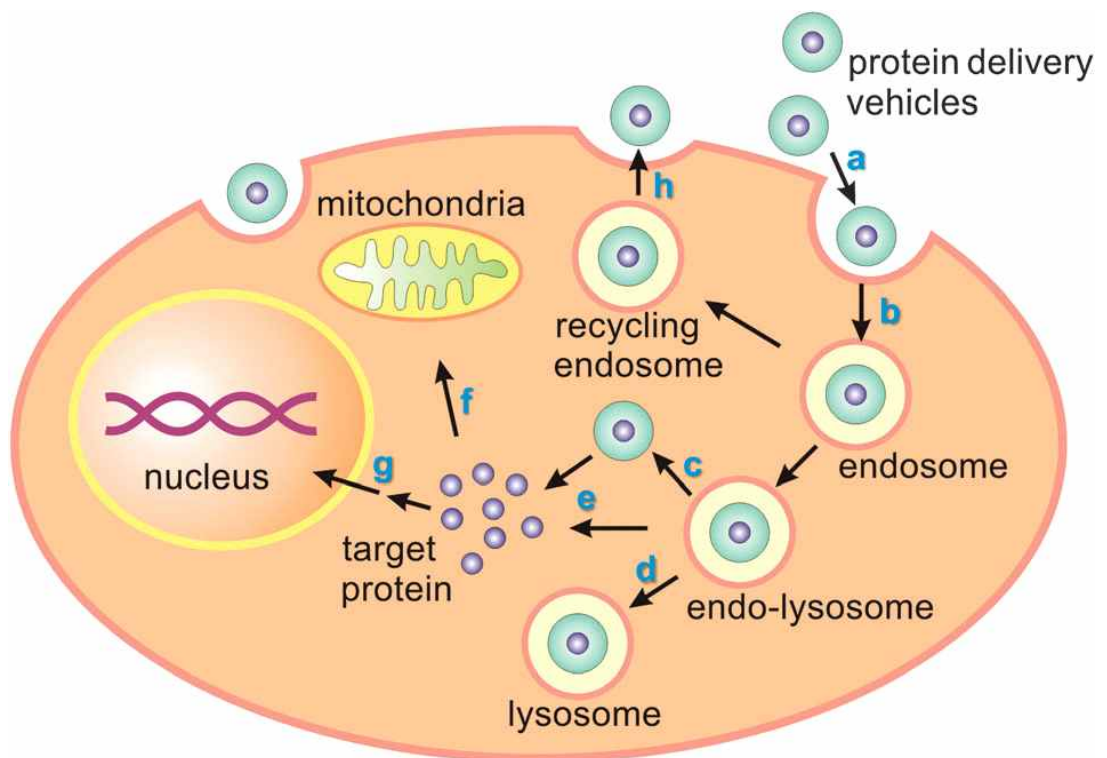


그림 2. 단백질 화물을 지닌 전달체들의 일반적인 endocytic pathway process 모식도. (a) 단백질 전달체들의 세포 표면 흡착; (b) endocytosis를 통한 전달체들의 internalization; (c) 전달체들의 endosomal escape 또는 (d) lysosomal degradation; (e) 목표 단백질의 cytoplasm에서의 확산; (f) 특정 세포 소기관으로의 목표 단백질 수송; (g) signal transduction과 같은 세포적 기능에 참여; (h) 전달체들의 exocytosis.¹⁴

최근 몇십 년간 나노 운반체를 기반으로 한 세포 내 단백질의 전달이 주목받아왔으며 밝은 전망을 보여주어 왔다. 이러한 운반체들이 주목받는 이유 중 하나는 생체 내 harsh한 환경에서 단백질이 분해되는 것을 보호하는 방어막의 역할을 해줄 수 있다는 점이다.^{14,21,22} 나노 운반체는 proteolysis로부터 단백질을 보호하며 따라서 in vivo 조건에서 단백질의 활성을 최대로 유지하며 전달시킬 수 있고, 또한 나노 물질 고유의 특성인 높은 surface-to-volume ratio를 지니고 있어 약물의 pharmacokinetics를 개선시킬 수 있다.^{14,22}

나노 운반체를 기반으로 한 전달 시스템의 또 다른 주요한 장점은 합성 과정에서의 control과 biocompatible한 화학적 변형을 통해 화학적·물리적 특성을 자유자재로 조절할 수 있다는 것이다.^{14,23,24} 단백질 전달 시스템의 endolysosomal escape, stability의 최적화, target 특이성 등을 개선하기 위하여 크기, 표면 전하 등 입자가 지닌 주요한 특성들이 용이하게 조절될 수 있다.

그림 3과 표 1에 요약된 것처럼, 단백질 전달을 위한 나노 운반체로 liposome, solid lipid nanoparticle, polymeric nanocarrier, inorganic nanoparticles/nanotubes, 단백질을 기반으로 한 운반체 등이 제작되고 사용되어 왔으며, 이러한 다양한 운반체들에 목표한 단백질 화물을 화학적 변형, 물리적 흡착 혹은 공유/비공유 캡슐화 등 각각 알맞은 전략들을 사용하여 loading하는 연구가 끊임없이 진행되어 왔다.

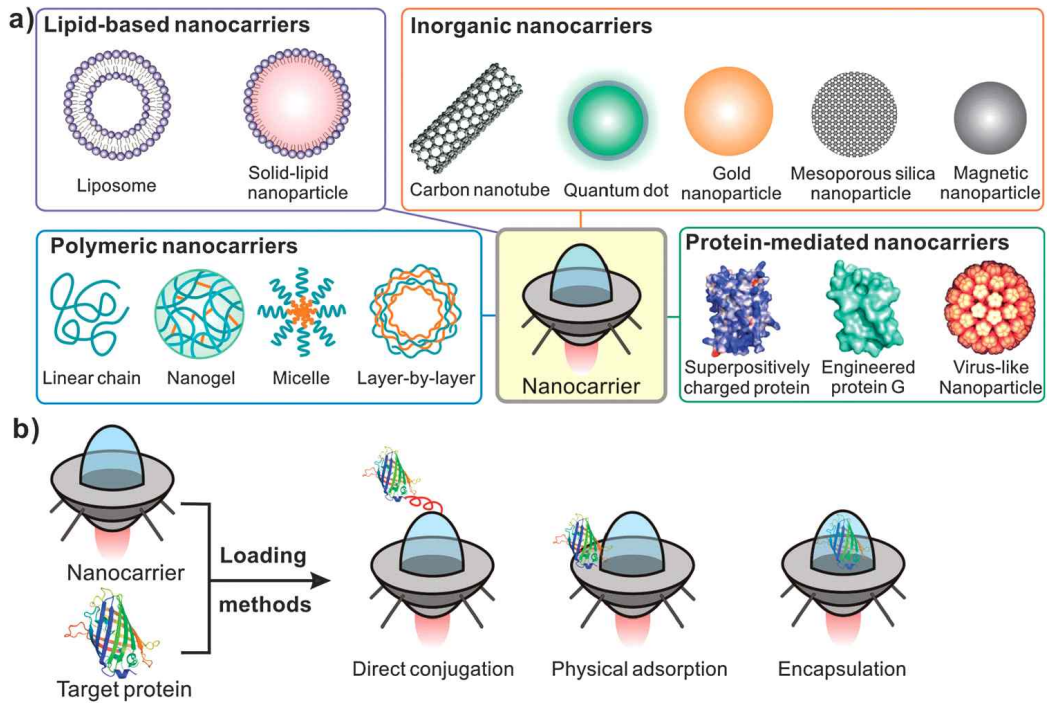


그림 3. (a) 단백질의 세포 내 전달에 쓰이는 다양한 유형의 나노 운반체들의 모식도. (b) 단백질/나노 운반체 복합체를 준비하기 위한 세 가지의 주요 loading methods. 각각의 다른 나노 운반체들은 “우주선”으로 표현되었다.¹⁴

Types of nanocarriers		Physical properties	Delivered protein	Cell lines used
Lipid-mediated	Cationic lipid TFA-DODAPL:DOPE	Positively charged	Phycoerythrin α -chain, β -chain; BSA; β -galactosidase; caspase-3; caspase 8; granzyme B; cytochrome <i>c</i>	NIH-3T3; HeLa-S3; BHK-21; CHO-K1; B16-F0; 293; MDCK; P19; Jurkat; Ki-Ras 267 β 1
	DOGS (dioctadecylglycylspermine)	Size: 500–900 nm; positively charged	BSA; β -galactosidase; IgG(anti-actin); IgG(anti-tubulin); phycoerythrin	CHO; BHK; Jurkat
	FuGENE6™; BioPORTER™	Positively charged	β -Galactosidase; caspase-3 Phycoerythrin	C6 glioma cells; rBCEC4 BHK-21
	Amphiphile (CholCSper)/DOPE	Size: 200 nm; positively charged	Phycoerythrin	
Polymeric-based	PEI-based attachment	Positively charged	RNase; eGFP; IgG; anti-S100C; p53; simian virus 40 large T-antigen	NIH-3T3; KMS-6; OUMS-36; HEK293; HeLa; K562; HFL-1; Saos-2 Jurkat
	PPAAc-NH ₂ /streptavidin		Biotinylated anti-CD3 antibody	
	Glucose-coated beads	Size: ~150 nm	EGFP	mES; Hela
	pH-responsive core-shell nanoparticles	Size: ~200 nm at pH 7.4, ~580 nm below pH 6.8	Ovalbumin (OVA)	BMDCs; dendritic DC2.4
	Self-assembled cationic nanogels	Size: ~20–40 nm; positively charged	BSA; β -galactosidase; Tat-NLS-GFP; BoHc/A	CHO-K1; cos-7; NIH-3T3; HeLa; nasal mucosal dendritic cells
	Acid-degradable particles by inverse emulsion polymerization	Size: 200–500 nm	OVA	RAW309.1 CR macrophage
	Acid-degradable particles by double emulsion evaporation	Size: ~250 nm	OVA	RAW309.1 CR macrophage
	Single-protein nanocapsules	Size: 8–20 nm; positively charged	GFP; BSA; HRP; SOD; caspase-3; Klf4	HeLa; MCF-7; CHO; MEF
	Charge-conversional polyion complex (PIC) micelles	Size: ~50 nm; positively charged	Cytochrome <i>c</i> ; anti-NPC mouse IgG	HuH-7
	Amphiphilic poly(amino acid) derivatives	Size: 250–300 nm; negatively charged	OVA	Immature DCs
Inorganic-based	Single-walled carbon nanotubes (SWNT)	Size: ~1–5 nm in diameter for SWNT	BSA; streptavidin; cytochrome <i>c</i>	HL60; Jurkat; CHO; NIH-3T3
	Quantum dots	Core diameter: ~20 nm	YFP; b-phycoerythrin	HEK 293T/17; COS-1
	Gold nanoparticles	Core diameter: ~2.5 nm; positively charged	β -Galactosidase	HeLa; COS-1; MCF-7; C2C12
	Mesoporous silica nanoparticles (MSN)	Size: ~200 nm; pore diameter: 5.4 nm	Cytochrome <i>c</i>	HeLa
	Hydrophobically functionalized silica nanoparticles	Size: ~15 nm	Anti-pAkt	MCF-7; NSCs
	Magnetic nanoparticles	Size: 300–400 nm; negatively charged; magnetic moment at saturation; 14.3 emu g ⁻¹	SOD; catalase	BAEC
		Size: 35 nm		
Protein-mediated	Polyomavirus-like nanoparticles	Positively charged	GFP	Swiss 3T3
	Superpositively charged GFP variants		Cre recombinase	HeLa; BSR; NIH-3T3; IMCD PC12
	Engineered protein G system		Goat anti-mouse IgG	HeLa

표 1. 최근에 발표된 세포 내 단백질 전달을 위한 나노 운반체들 요약.

그 중에서도 최근에는 높은 광학적 흡광도와 NIR photoluminescence를 지니고 있어 imaging에 광학적 tag로 사용 가능한 single-walled carbon nanotube (SWNT), 뛰어난 열적 안정성과 좁고 대칭적인 emission spectrum을 지녀 형광 probe로 쓰이는 quantum dots (QDs)³¹, 표면 개질이 용이할 뿐 아니라 고유의 분광학적 특성을 지녀 β -galactosidase의 전달에도 쓰인 바 있는²⁸ gold nanoparticle (그림 4), 대량 생산이 가능하고 표면 개질과 넓은 표면적, 높은 pore volume을 지녀 controlled release에 많이 사용되는 MSN 등의 inorganic한 나노 운반체들이 많이 쓰여 왔다.

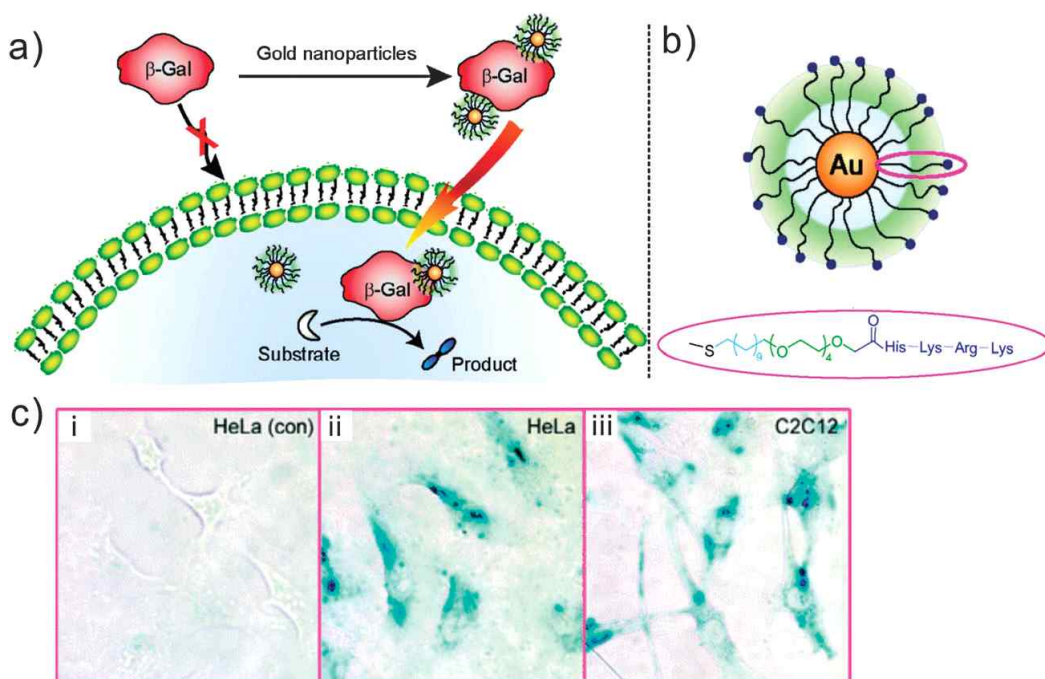


그림 4. Rotello와 동료들이 개발한, gold nanoparticle을 이용한 세포 내 단백질 전달 시스템. (a) 세포 내 전달 과정의 모식도. (b) ligand가 붙은 나노 입자의 구조. (c) (i) HeLa cell과 native한 β -galactosidase (β -Gal); (ii) HeLa cell과 gold nanoparticles/ β -Gal (100 nM/50 nM) (iii) C2C12 cell과 gold nanoparticles/ β -galactosidase (100 nM/50 nM) 세 sample에 transfection 후 X-gal 염색을 진행한 결과.¹⁴

1.2 Mesoporous Silica Nanoparticle

위에 언급한 다양한 운반체들 중, 1992년 계면 활성제를 기반으로 하여 mesoporous silica 물질을 합성하는 방법이 발견된 이후로²⁹ mesoporous silica microsphere과 nanosphere의 형태를 거쳐 탄생한 mesoporous silica nanoparticle (MSN)은, 넓은 표면적, 뛰어난 생체 적합성, 대량 생산의 용이성, 쉬운 표면 개질, 생산 공정에서의 구조적 안정성 등의 많은 장점들로 인해, 2001년 MCM-41 type MSN이 처음 약물 전달 시스템에 활용된 이후³⁰ 다양한 약물을 생체 내로 전달하는 데 사용되어 왔다 (그림 5).

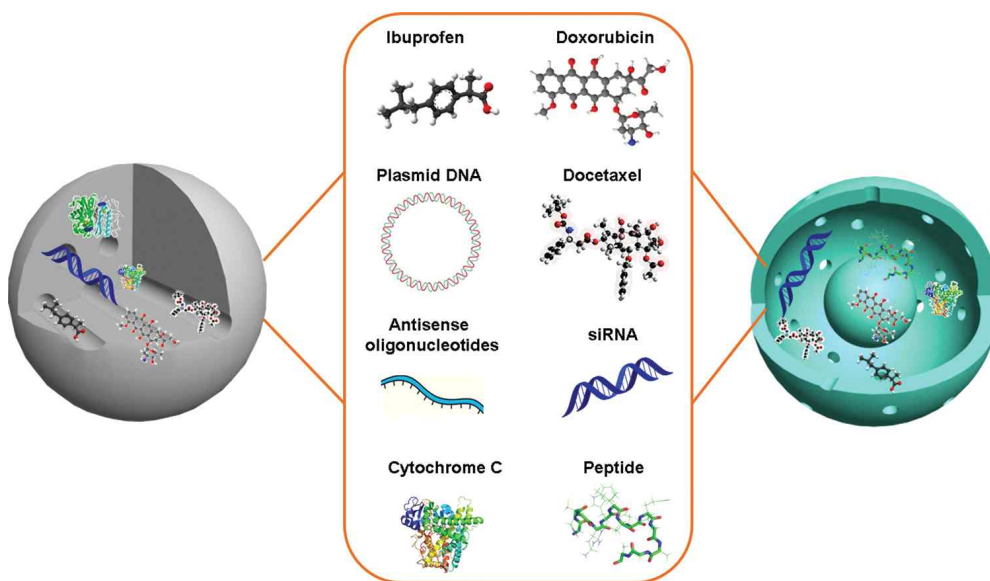


그림 5. 약물 (ibuprofen, doxorubicin, docetaxel), 치료 유전자 (plasmid DNA, antisense oligonucleotides, siRNA), 치료 단백질/peptide (cytochrome C와 peptide)를 포함한 다양한 치료제를 위한 다용도의 약물 전달 시스템 개발에 활용되는 MSN.²⁵

특히 입자가 가진 다공성은 스마트한 약물 전달 시스템에 매력적인 특성들을 가지고 있다는 것이 증명되었으며, 약물 전달 시스템의 효율을 높이기 위해 gatekeeping concept (그림 6)와 다양한 controlled release 전략이 활용되기도 하였다.

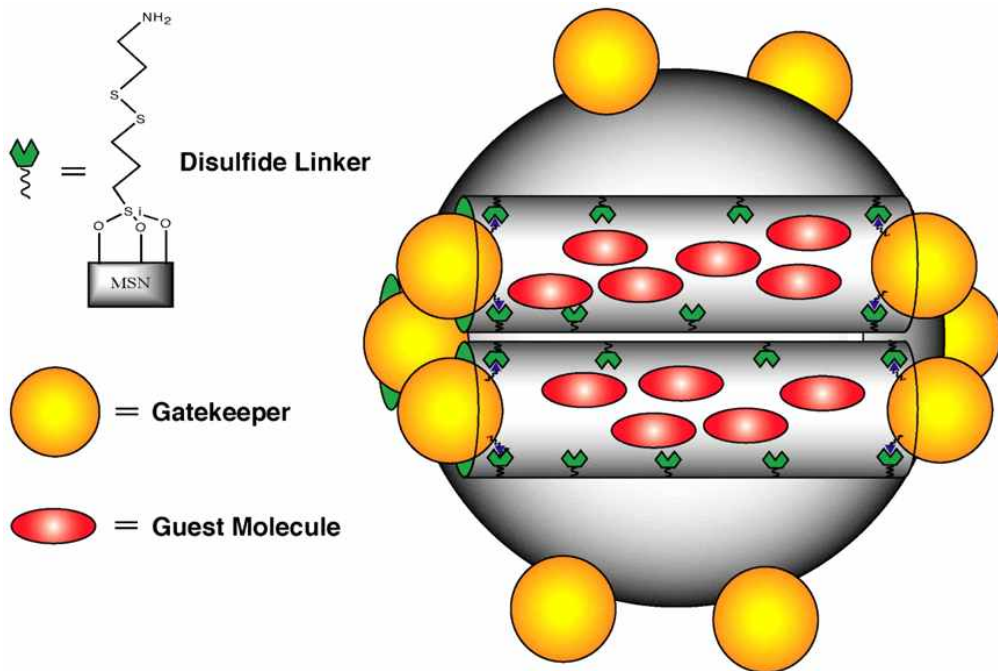


그림 6. guest 분자들이 loading되었으며 끝은 일반적인 gatekeeper로 봉해진 MSN의 모식도²⁹

이렇듯 다양한 약물뿐 아니라 단백질들의 전달에도 이용되어 온 실리카 입자는, 그러나 기공의 크기로 인해 큰 단백질을 전달하는 데 제약이 있어서 기공이 확장된 MSN의 필요성이 대두되고 있으며, 기존에 발표된 MSN의 기공 확장 방법은 재현성이 떨어지는 한계를 보여서, 이에 우리의 전 논문에서는 큰 기공을 가진 MSN을 용이하게 대량 생산할 수 있음을 증명하였다.^{26,27}

그래서 우리는 기공 확장된 MSN을 기반으로 하여 효율적으로 단백질을 전달하는 시스템에 대해 보고한다 (그림 7). 넓은 기공을 가진 MSN은 위의 조건을 모두 충족하여 단백질 전달 시스템을 개발하는 데 있어 잠재력을 갖추고 있음을 보이는 데 이용되었다. 넓은 기공이 큰 단백질의 전달에 있어 로딩 용량과 보호 능력을 증가시킬 수 있다고 기대되어, 사이즈가 큰 단백질을 대상으로 실험을 진행하였다.

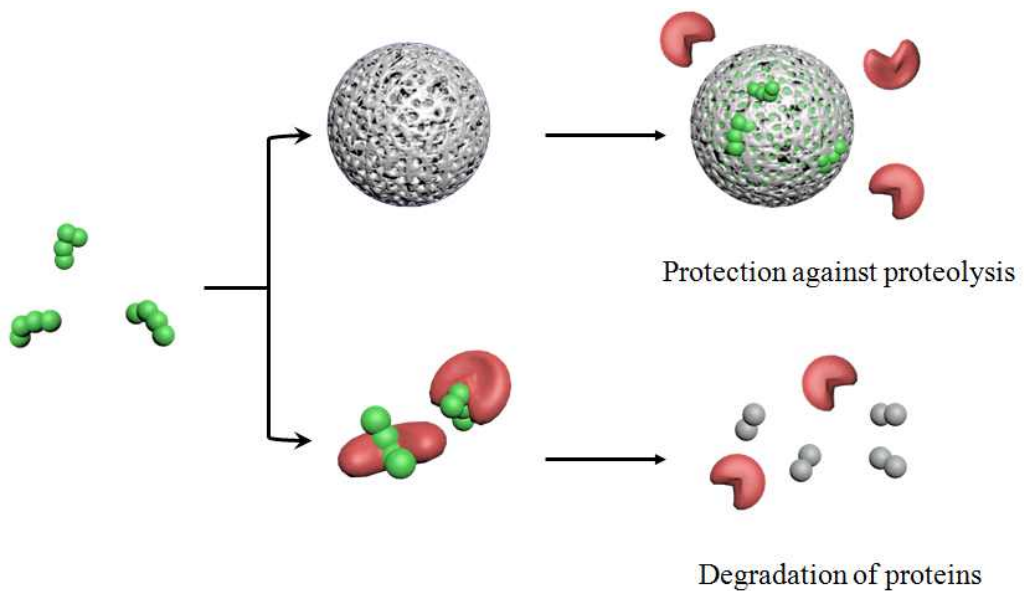


그림 7. 기공 확장된 MSN을 기반으로 한 단백질 전달 시스템 : 효소 분해의 확률을 최소화하는 전략

2. Experimental Section

2.1 Materials

Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 은 Acros (New Jersey, USA)에서 구입하였다. Ethanol은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), tetramethyl orthosilicate (TMOS), toluene, dimethylsulfoxide (DMSO), mesitylene (trimethyl benzene, TMB)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였다. β -galactosidase는 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Sodium hydroxide는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 모든 시약들은 별도의 정제 없이 사용하였다. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (fetal bovine serum), PBS (pH 7.4)는 WelGENE Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하였다. CCK-8 (Cell Counting Kit-8)은 Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Rockville, USA)에서 구입하였다.

2.2 기공 확장된 MSN-NH₂와 MSN-OH (silanol)의 합성

MSN은 전에 발표된 논문²⁷에 따라 합성되었다. 합성된 입자는 140°C, hydrothermal한 조건에서 100시간 동안 mesitylene으로 처리되었다. 혼합물은 상온에서 냉각되었고, 가루 형태로 얻기 위해 충분한 양의 ethanol로 washing하여 filtering하였다. Template 추출은 2 M의 ethanolic 염산 수용액에서 autoclave, 140°C, overnight 조건에서 행해졌다. 결과물은 ethanol로 충분히 filter되고 wash되었다. 건조된 powder

(100 mg)은 10 mL의 toluene에 분산된 후 aminopropyltriethoxysilane (APTES, 0.5 mL)을 가하였다. 혼합물은 overnight으로 reflux되었고, filter된 후 충분한 양의 물과 ethanol로 wash되었다. 정제된 백색의 powder (50 mg)는 1 mL의 DMSO에 분산되었고, DMSO에 녹인 TAMRA 수용액 (2.5 mg/mL)의 DMSO stock에 20 μ L의 TAMRA 수용액이 분산된 용액에 가해졌다. 혼합물은 overnight으로 반응되었고, 원심분리된 후 supernatant가 제거되었다. Pellet은 ethanol과 물에 다시 분산된 후, 원심분리와 재분산의 과정이 10번 이상 반복되었다. Silanol기가 끝에 달린 입자는 추출 뒤 사용되었다. 건조된 가루는 다음의 사용을 위해 10 mg/mL의 농도로 물에 분산되었다. ExMSN-NH₂와 ExMSN-OH의 zeta potential 값은 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK)를 이용해 측정되었다.

2.3 기공 확장된 MSN의 특성 결정 (characterization)

질소 흡착 등온곡선은 volumetric Micromeritics Tristar-II instrument를 사용하여 77 K의 액체질소 온도에서 얻었다. 측정 전에, 샘플은 573K에서 12시간 동안 degas되었다. 특정 표면적은 압력 범위 $P/P_0 = 0.1 \sim 0.3$ 에서 얻어진 흡착 데이터를 사용하여 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 방정식을 사용하여 계산하였으며, 기공의 크기 분포는 BJH 방정식을 이용하여 계산하였다. 투과형 전자 현미경 (TEM) 관찰은 120 kV에서 LIBRA 120 (Carl Zeiss, German)를 사용하여 진행하였다.

2.4 입자 내 단백질의 로딩 방법

β -galactosidase는 PBS에서 amine이 끝에 달린 MSN에 loading한 뒤 4°C에서 1시간 동안 incubate하였다. β -galactosidase가 loading된 정도

는 입자 1 mg 당 125 μ g이다.

2.5 Cell culture

HeLa (Human cervical cancer cell line) cell은 4.5 g/L D-glucose를 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 culture하였으며 10%의 fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL의 penicillin 그리고 100 g/mL의 streptomycin을 추가하였다. 세포들은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 습도가 유지되는 incubator에서 유지하였다.

2.6 세포 독성 assay (CCK-8 assay)

물질의 세포 독성은 CCK-8 assay를 이용해서 입자를 처리한 뒤 HeLa cell의 viability를 검사하는 방법으로 측정하였다. HeLa cell은 입자 처리 전에 96-well cell culture plate에서 well당 1×10^4 개 농도로 24시간 동안 seed하였다. 24시간의 incubation 후, cell들은 amine과 silanol이 끝에 달린 두 종류의 입자들을 사용하여 다양한 농도로 처리하였으며, control cell은 같은 volume의 PBS로 처리하였다. 24시간 후 media를 제거하였고, 100 μ l의 serum-free media와 10 μ l의 CCK-8 용액을 각 well마다 가하였다. Cell들은 2시간 동안 incubate하였다. Formazan salt의 450 nm에서의 흡광도는 microplate reader (Molecular Devices, Inc., USA)를 이용하여 측정하였으며, media의 기본 흡광도 값을 감하였다. 실험은 세 번 반복하여 수행하였으며, data는 mean \pm SEM 으로 정리하였다.

3. Result and Discussion

우리는 기존의 방법인 CTAB을 template로 하여 NaOH 조건에서 합성하는 방법을 통해 균일한 사이즈 분포를 갖는 MSN을 합성한 후 (MSN2)³², trimethylbenzene (TMB)를 swelling agent로 처리한 다음 수열반응을 통해 기공의 크기가 25 nm 보다 넓도록 확장하였으며, 합성된 입자 (Ex-MSN) 와 기공을 확장하지 않은 입자를 질소흡착 실험을 통하여 특성을 비교하였다 (표 2).

	Mean pore size (nm)	BET surface area (m ² /g)	Pore volume (mL/g)
MSN2	2.1	1337	0.69
Ex-MSN	25-30	388	1.47

표 2. 질소 흡착을 통해 확인한 MSN의 특성

기공을 확장하기 전의 MSN2 입자에 비해 기공 확장한 Ex-MSN은 pore size가 크게 넓어진 것을 확인할 수 있으며, 표면적은 줄어들고 pore volume이 늘어났음을 확인할 수 있었다. 비록 표면적이 줄었으나, 단백질과 같은 크기가 큰 약물을 loading하는 경우 유효한 표면적이 넓어진 것이라고 할 수 있다. 이러한 합성법을 통해 기존의 다른 연구들에서 보고된 바와 같은 surfactant나 고분자 등을 사용하지 않고 재현성이 높으며 입자 사이즈 분포가 좁은 입자를 큰 스케일로 합성할 수 있었다.

TEM 이미지를 통해 통상적인 방법으로 합성된 MSN2에 비해 넓어진 기공의 크기를 확인할 수 있다 (그림 8).

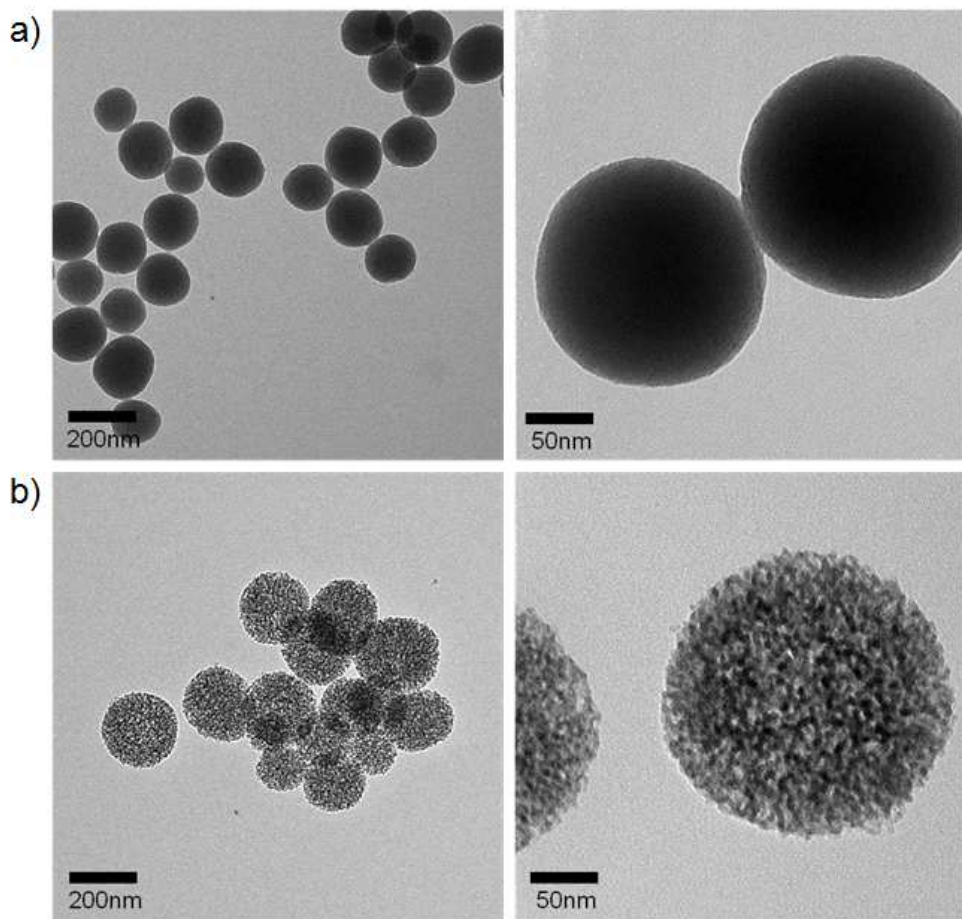


그림 8. 합성된 입자의 TEM 이미지 a) 기존의 방법으로 합성된 다공성 실리카 나노 입자 b) 기공 확장된 실리카 나노 입자

입자의 표면은 표면 전하를 다르게 하여 (+) charge를 갖도록 아민 작용기로 변형하거나 (-) charge를 갖도록 silanol기로 변형하여 사용하였으며, 아민 작용기로 변형된 입자는 aminopropyltriethoxy silane (APTES) 를 열처리 후 세포 내 이미지를 확인하기 위해 NHS activated TAMRA를 도입하였다. MSN의 표면 개질은 silane coupling을 통해 손쉽게 진행할 수 있기 때문에, 표면 반응을 수행할 때

큰 장점을 지닌다. 합성된 입자들의 zeta potential 값은 기대대로 각각 +17.8 mV와 -18.2 mV로 측정되어 원하는 표면 개질이 성공적으로 진행되었음을 알 수 있었다. 또한 약물 전달 시스템으로 적용하기 위해 세포 내 독성을 확인해 보았다. CCK-8 assay를 통해 320 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리해 보았을 때, 일반적으로 사용되는 농도의 범위에서 두 입자 모두 특정할 만한 독성을 보이지 않았다 (그림 9).

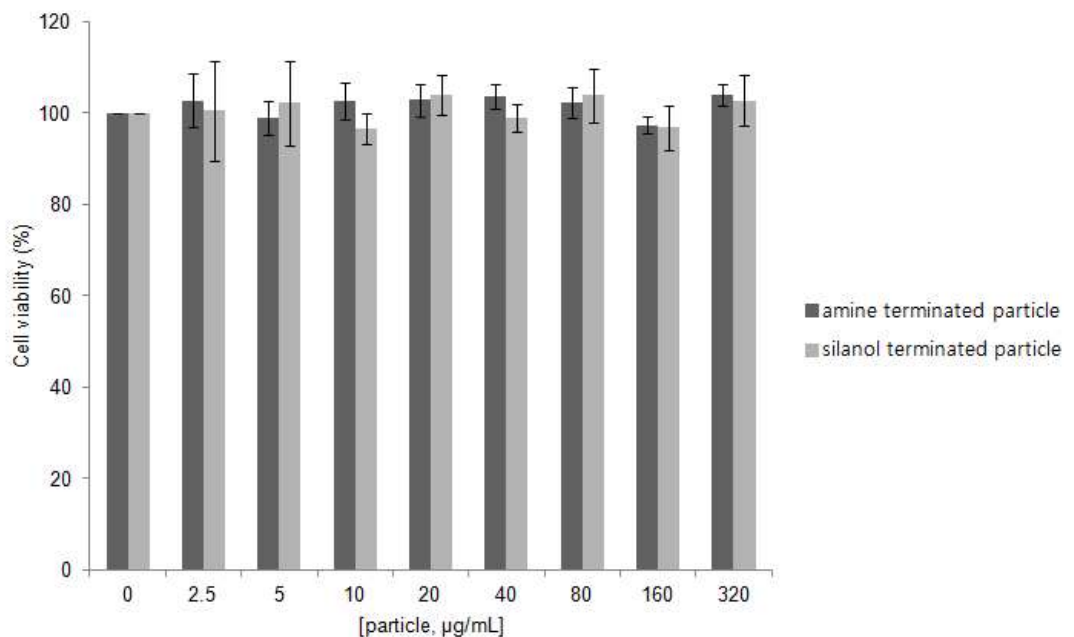


그림 9. CCK-8 assay를 통한 합성된 입자들의 세포 독성 테스트 결과.

다음으로는 합성된 입자의 잠재력을 보기 위해 큰 단백질을 효율적으로 전달하는지, 그리고 잘 보호하는지를 조사하였으며, 큰 단백질의 후보로는 β -galactosidase를 선택하였다. β -galactosidase는 일반적인 drug에 비해 훨씬 큰 사이즈 (465 kDa, 17.5 nm x 13.5 nm x

9 nm) 를 가지고 있으며 staining이 가능하여 세포 내에서의 관찰이 가능하고 activity assay가 용이하므로 model protein으로 많이 쓰이며, β -galactosidase의 pI 값 (=4.6) 에 비해 일반적인 생체 내 조건의 pH 값 (=7.4)이 높아 (-) charge를 띠고 있기 때문에 amine기로 변형된 (+) charge를 가진 입자와 electrostatic interaction을 통해 쉽게 conjugate될 수 있으리라 생각되어 선택하게 되었다. β -galactosidase는 기공 확장된 MSN에 간단한 mixing 후 incubation을 통해 쉽게 loading할 수 있었으며, loading capacity는 입자 1 mg당 125 μ g의 단백질이 loading되는 것으로 계산되었다.

세포 도입을 보기 위해 β -galactosidase가 loading된, amine 작용기로 변형된 입자를 HeLa cell에 처리하였으며, 세포 내로 도입된 β -galactosidase를 관찰하기 위해 세포들을 X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside) 로 염색하였다. X-gal은 효소가 매개하는 가수분해 반응에 의해 불용성의 푸른 화합물로 변하게 되므로, (그림 10.) 세포 내로 전달된 β -galactosidase의 활성을 알아보는 데 유용한 실험이다.

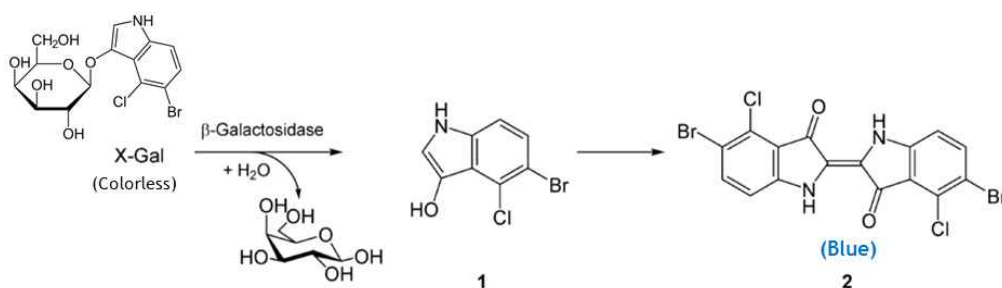


그림 10. β -galactosidase가 매개하는 X-gal staining의 원리.

그림 12a 에서 β -galactosidase가 거의 모든 세포 내에 고르게 관찰되는 것을 보아 세포 내 도입이 잘 이루어짐을 알 수 있으며, β -galactosidase의 농도가 증가할수록 푸른 색의 정도가 점점 짙어지는

것을 통해 단백질의 세포 내 도입과 β -galactosidase의 enzymatic performance가 농도에 비례하여 효율적으로 일어남을 알 수 있다.

다음으로 세포의 lysate을 이용한 ONPG assay를 통해 β -galactosidase의 세포 내 활성을 측정하였다. ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactoside) 역시 X-gal과 비슷하게 효소가 매개하는 가수분해 반응을 통하여 노란 색의 o-nitrophenol (ONP)로 변하게 되므로, (그림 11.) o-nitrophenol이 420 nm에서 나타내는 흡광도를 측정하여 β -galactosidase의 활성 정도를 알아낼 수 있다.

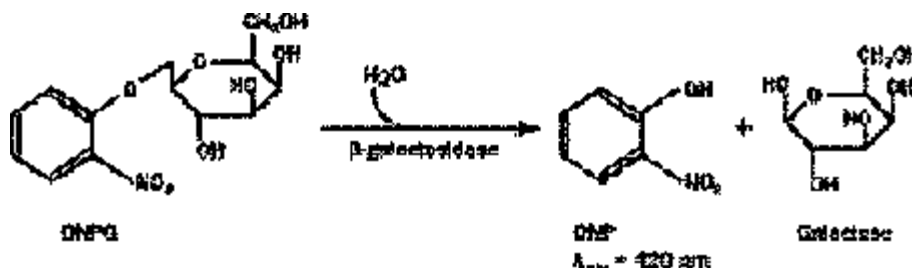


그림 11. β -galactosidase가 매개하는 ONPG assay의 원리.

그 결과 MSN의 존재가 naked protein과 비교하였을 때 activity에 영향을 주지 않음을 알 수 있었으며, 세포의 lysate에서도 농도에 비례하여 activity가 잘 유지되는 것으로 보아 β -galactosidase의 큰 size에도 불구하고 세포막을 잘 통과하여 세포 내 도입이 잘 이루어졌음이 관찰된 반면, naked protein의 경우 전의 결과와 마찬가지로 세포막을 통과할 수 없음을 알 수 있었다. 따라서 단백질 자체로는 세포 내 도입이 불가능한 반면, 기공 확장된 MSN에 loading시켰을 경우 loading된 단백질의 activity가 유지될 뿐 아니라 효율적인 세포 내 도입을 통해 세포 내에서도 농도에 비례하여 activity를 나타내는 것을 확인함으로써 효율적인 β -galactosidase 전달 시스템으로 작용함을 알 수 있었다.(그림 12b).

단백질 치료학에서 다루어지는 주요 이슈 중 하나는 세포 안과 밖의 위험한 환경에 의해 단백질의 분해나 변성이 일어나 그 기능이 손실되는 것을 어떻게 줄이느냐이다. 기공 구조는 단백질을 기공 안에 보호함으로써 이러한 문제들을 극복하는 데 장점을 가지고 있다. 단백질 보호에 큰 기공이 가지는 이점을 증명하기 위해 β -galactosidase를 1) naked protein 2) 기존 방법으로 합성된 실리카 나노 입자에 loading 3) 기공 확장된 MSN에 loading 후, 세 가지 형태의 물질에 chymotrypsin을 처리하여 β -galactosidase의 활성을 비교하였다. 그 결과로 오로지 기공 확장된 MSN에 loading된 단백질만이 활성을 어느 정도 유지함을 관찰하였으며 (그림 12c), 작은 크기 (2 nm)의 기공을 가진 MSN은 naked의 단백질과 같이 낮은 보호 효과를 보였다. 큰 사이즈 (465 kDa 분자량, 17.5 nm x 13.5 nm x 9 nm) 단백질의 세포 내 효율적인 전달과 단백질 분해 효소의 존재 하에서 loading된 단백질의 보호 효과를 증명하였으며, 이로 인해 우리는 확장된 기공을 가진 MSN이 β -galactosidase의 전달에 중요한 잠재력을 가지고 있음을 결론지을 수 있었다.

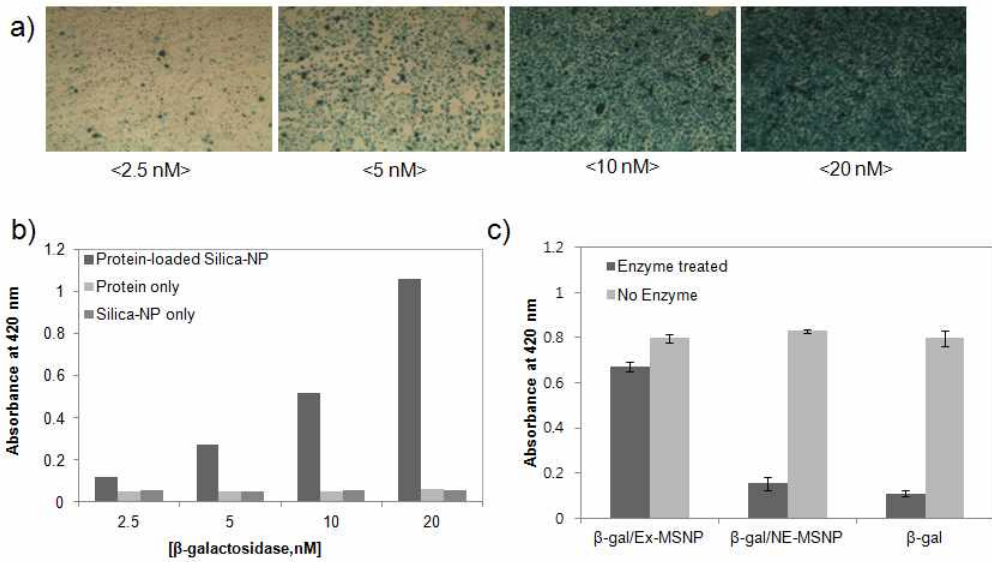


그림 12. β -galactosidase의 분해 효소에 대한 보호 효과와 전달 효율. a), b) HeLa 세포 내로의 β -galactosidase 전달 : a) β -galactosidase의 효율적인 도입을 X-gal 염색법으로 확인 b) β -galactosidase 처리 후 세포 lysate를 ONPG assay로 확인. c) 분해 효소 (chymotrypsin) 처리 후 입자의 단백질 보호 효과 관찰

4. Conclusion

결론적으로, β -galactosidase의 delivery를 통해 우리는 기공을 확장한 MSN이 기존의 MSN과 비교하여 큰 사이즈의 단백질을 더욱 효율적으로 전달할 수 있음을 증명하였으며, 무엇보다도 입자의 큰 기공이 큰 사이즈의 단백질의 보호 효과에 뛰어나다는 것 역시 증명하였다. 또한 단백질을 loading한 입자가 효과적으로 세포 내에도입, 세포 내에서의 release 역시 효과적으로 이루어짐을 보였으며, loading된 단백질의 activity가 세포 내에서도 유지됨을 증명하였다. 이 결과들은 기공 확장된 실리카 나노 입자가 단백질 전달체로서 큰 잠재력을 가지고 있다는 것을 보여준다. 단백질들은 고유의 크기와 표면 전하 등의 특성들로 인해 유전자와는 달리 일반적인 전달체를 만드는 데 어려움이 있었지만, 우리는 기공 확장된 실리카 나노 입자를 단백질 전달 시스템에 적용시킬 수 있음을 보였으며, 가까운 미래에 입자의 특성을 변환시켜 다양한 단백질의 delivery에 적용해 보고, 입자에 대한 in vivo 에서의 biodistribution과 bioavailability를 더욱 자세히 연구할 예정이다.

5. Reference

1. Leader, B.; Baca, Q.J.; Golan, D.E. Protein Therapeutics: a Summary and Pharmacological Classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 21-39.
2. Sinha, V.R.; Trehan, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release.* **2003**, *90*, 261-280.
3. Lee, Y.; Ishii, T.; Cabral, H.; Kim, H. J.; Seo, J. H.; Nishiyama, N.; Oshima, H.; Osada, K.; Kataoka, K. Charge-Conversional Polyionic Complex Micelles-Efficient Nanocarriers for Protein Delivery into Cytoplasm. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5309-5312.
4. Lim, J.; Duong, T.; Lee, G.; Seong, B. L.; El-Rifai, W.; Ruley, H. E.; Jo, D. The Effect of Intracellular Protein Delivery on the Anti-Tumor Activity of Recombinant Human Endostatin. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6261-6271.
5. Lee, Y.; Ishii, T.; Kim, H.J.; Nishiyama, N.; Hayakawa, Y.; Itaka, K.; Kataoka, K. Efficient Delivery of Bioactive Antibodies into the Cytoplasm of Living Cells by Charge-Conversional Polyion Complex Micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2552-2555.
6. Nochi, T.; Yuki, Y.; Takahashi, H.; Sawada, S.; Mejima, M.; Kohda, T.; Harada, N.; Kong, I. G.; Sato, A.; Kataoka, N.; Tokuhara, D.; Kurokawa, S.; Takahashi, Y.; Tsukada, H.; Kozaki, S.; Akiyoshi, K.; Kiyono, H. Nanogel Antigenic Protein-Delivery System for Adjuvant-Free Intranasal Vaccines. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 572-578.
7. Yan, M.; Du, J.; Gu, Z.; Liang, M.; Hu, Y.; Zhang, W.; Priceman, S.; Wu, L.; Zhou, Z. H.; Liu, Z.; Segura, T.; Tang, Y.; Lu, Y. A Novel Intracellular Protein Delivery Platform Based on Single-Protein Nanocapsules. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 48-53.
8. Wang, M.; Alberti, K.; Sun, S.; Arellano, C.L.; Xu, Q. Combinatorially Designed Lipid-like Nanoparticles for Intracellular Delivery of Cytotoxic Protein for Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2893-2898.
9. Liu, Y.; Wang, H.; Kamei, K.; Yan, M.; Chen, K.-J.; Yuan, Q.; Shi, L.; Lu, Y.;

- Tseng, H.-R. Delivery of Intact Transcription Factor by Using Self-Assembled Supramolecular Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3058-3062.
10. Wu, J.; Kamaly, N.; Shi, J.; Zhao, L.; Xiao, Z.; Hollett, G.; John, R.; Ray, S.; Xu, X.; Zhang, X.; Kantoff, P. W.; Farokhzad, O. C. Development of multinuclear polymeric nanoparticles as robust protein nanocarriers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8975-8979.
 11. Tang, R.; Kim, C. S.; Solfiell, D. J.; Rana, S.; Mout, R.; Velazquez-Delgado, E. M.; Chompoosor, A.; Jeong, Y.; Yan, B.; Zhu, Z.-J.; Kim, C.; Hardy, J. A.; Rotello, V. M. Direct Delivery of Functional Proteins and Enzymes to the Cytosol Using Nanoparticle-Stabilized Nanocapsules. *ACS Nano* **2013**, *7*, 6667-6673.
 12. Biswas, A.; Joo, K.-I.; Liu, J.; Zhao, M.; Fan, G.; Wang, P.; Gu, Z.; Tang, Y. Endoprotease-Mediated Intracellular Protein Delivery Using Nanocapsules. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1385-1394.
 13. Biswas, A.; Liu, Y.; Liu, T.; Fan, G.; Tang, Y. Polyethylene Glycol-Based Protein Nanocapsules for Functional Delivery of a Differentiation Transcription. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5459-5467.
 14. Gu, Z.; Biswas, A.; Zhao, M.; Tang, Y. Tailoring nanocarriers for intracellular protein delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3638-3655.
 15. Bale, S.S.; Kwon, S.J.; Shah, D.A.; Banerjee, A.; Dordick, J.S.; Kane, R.S. Nanoparticle-Mediated Cytoplasmic Delivery of Proteins to Target Cellular Machinery. *ACS Nano*. **2010**, *4*, 1493-1500.
 16. Manning, M.C.; Patel, K.; Borchardt, R.T. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 903-918.
 17. Zale, S.E.; Klibanov, A.M. Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures?. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5432-544.
 18. Wang, W. Oral protein drug delivery. *J. Drug Target.* **1996**, *4*, 195-232.
 19. Bareford, L. M.; Swaan, P. W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 748-58.
 20. Sawant, R.; Torchilin, V. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 628-640.

21. Faraji, A. H.; Wipf, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2950–2962.
22. Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O.C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.
23. Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5418–5429.
24. Stuart, M. A.; Huck, W. T.; Genzer, J.; Muller, M.; Ober, C.; Stamm, M.; G. Sukhorukov, G. B.; Szleifer, I.; Tsukruk, V. V.; Urban, M.; Winnik, F.; Zauscher, S.; Luzinov, I.; Minko, S. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 101–113.
25. Tang, F.; Li, L.; Chen, D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504–1534.
26. Kim, M.-H.; Na, H.-K.; Kim, Y.-K.; Ryoo, S.-R.; Cho, H. S.; Lee, K.E.; Jeon, H.; Ryoo, R.; Min, D.-H. Facile Synthesis of Monodispersed Mesoporous Silica Nanoparticles with Ultralarge Pores and Their Application in Gene Delivery. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3568–3576.
27. Na, H.-K.; Kim, M.-H.; Park, K.; Ryoo, S.-R.; Lee, K. E.; Jeon, H.; Ryoo, R.; Hyeon, C.; Min, D.-H. Efficient Functional Delivery of siRNA using Mesoporous Silica Nanoparticles with Ultralarge Pores. *small* **2012**, *8*, 1752–1761.
28. Ghosh, P.; Yang, X.; Arvizo, R.; Zhu, Z. J.; Agasti, S. S.; Mo, Z.; Rotello, V. M. Intracellular delivery of a membrane-impermeable enzyme in active form using functionalized gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2642–2645.
29. Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Wu, C.-.; Lin, V. S. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1278–1288
30. Vallet-Regí, M.; Rámila, A.; del Real, R. P.; Pérez-Pariente, A new property of MCM-41: drug delivery system. *J. Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308.
31. Derfus, A. M.; Chen, A. A.; Min, D. -H.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N. Targeted

- Quantum Dot Conjugates for siRNA Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1391.
32. Yano, K.; Fukushima, Y. Synthesis of mono-dispersed mesoporous silica spheres with highly ordered hexagonal regularity using conventional alkyltrimethylammonium halide as a surfactant. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1579-1584

Abstract

The development of functional protein delivery system is challenging because of the nature of proteins despite its great potentials for useful tool in fundamental biology and therapeutics in various diseases. Here it is demonstrated that mesoporous silica nanoparticle (MSN) could serve as an efficient intracellular delivery system for various proteins through easy and safe complex formation step requiring simple mixing of nanoparticles and proteins in aqueous condition without any modification of proteins and involvement of organic solvents. Also large pore allowed the protection of cargo from being degraded by protease. Based on results for proteins possessing various properties, it is suggested that our system could provide potentials to be a universal intracellular protein delivery tools.

Keywords : protein delivery, nanocarrier, intracellular delivery, mesoporous silica nanoparticle